

⑫ 公開特許公報(A)

平2-129119

⑤Int.Cl.⁵
A 61 K 9/127識別記号 庁内整理番号
F 7417-4C

⑬公開 平成2年(1990)5月17日

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全7頁)

⑭発明の名称 リボソーム製剤

⑮特 願 昭63-279420

⑯出 願 昭63(1988)11月7日

⑰発明者	日比野英彦	東京都練馬区旭丘2丁目22番1号
⑰発明者	福田信雄	茨城県つくば市梅園2丁目24番5号
⑰発明者	仲地理	茨城県牛久市下根町1044番10号
⑰出願人	日本油脂株式会社	東京都千代田区有楽町1丁目10番1号
⑰代理人	弁理士舟橋栄子	

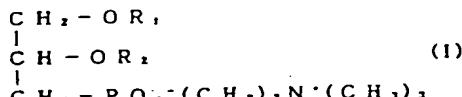
明細書

1. 発明の名称

リボソーム製剤

2. 特許請求の範囲

一般式 (I) :



(式中、R₁はオレオイル基又はバルミトイル基であり、R₂はエイコサペンタエノイル基又はドコサヘキサエノイル基である)で示される化合物の少なくとも1種を構成成分とするリボソーム製剤。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、高度不飽和脂肪酸誘導体からなるリボソーム製剤で新規医薬品用途に関するものである。本発明の高度不飽和脂肪酸誘導体からなるリボソーム製剤は、抗血栓、抗喘息、抗腫瘍作用等の生理活性を有している。

(従来の技術)

リン脂質は、水中で脂質二分子膜より成る直径0.05~10μmのリボソームという分子集合体を形成することが知られている。このリボソームは、薬剤や酵素を封入した一種のマイクロカプセル材料であり、どちらかというと生理活性を有する薬剤を内包して運搬補助する働きを示す。また、以前からリン脂質自体が動脈硬化症、神経症、肝機能障害、胆石症、未熟児呼吸困難症、炎症等に有効であることも知られている。生体膜には1000種以上のリン脂質が存在すると言われ、これらの示す生物活性が徐々に明らかにされつつある。

最近になって、植物性ホスファチジルイノシトールが癌細胞に特異的に細胞毒性を示すこと、溶血性を有するリゾホスファチジルコリンがマクロファージ活性化能を示すこと、血小板活性化因子が血小板活性化作用やマクロファージ活性化能及び血圧低下作用等の様々な反応を生体内において引き起こすことが判明している。

(発明が解決しようとする課題)

生理活性を有する特定構造のリン脂質について、本発明者らは、喘息、アレルギー、炎症、心筋梗塞、消化器疾患で重要な役割を示すロイコトリエンをアラキドン酸から產生する酵素である 5-リボキシゲナーゼの特異的阻害剤（特許願昭和63-192794、抗アレルギー剤）や奇形腫細胞や赤芽球性白血病細胞に対し強力な分化誘導活性を示す制癌剤（特許願昭和62-318616、制癌剤）に有効であることを見出した。

これらのリン脂質は S n - 1 位にオレオイル基やバルミトイル基を有し、S n - 2 位にエイコサベンタエノイル基やドコサヘキサエノイル基を有するホスファチジルコリンが主要成分である。そのため、これらのホスファチジルコリンは主として細胞に対して細胞毒性を生じない溶剤、例えはエタノールに溶解してその生理活性を確認した。製剤化についてもこれらの物質の特性からエタノールに溶解した静脈内注射剤や脂溶性カプセル剤に加工されている。

脂溶性カプセル剤は、これらの化合物を乳糖と

セルロースと共に粒状に成形し、これを基材として流動床内で浮遊流動させつつセルロースとフタレートからなる被覆基材でコーティングし脂溶性の顆粒剤としている。それゆえ、脂溶性カプセル剤中の目的化合物の含量が低く、その吸収も腸管よりなされる。目的化合物の生理活性を生体内でより強く發揮させるため投与量を多くすると、この剤型では被覆基材の連続大量摂取を伴う。そのため、このような被覆基材の大量摂取を伴わず、より効率的な投与量の確保および目的部位へのより多くの取込みを可能にする剤型が望まれる。注射・点滴剤は、これらの化合物を数百倍のぶどう糖に分配し、使用前にエタノールに溶解し、これに生理的食塩水を多量に添加して調整し使用される。従って、注射・点滴剤中の目的化合物の含量が全量に対して非常に低く、また、使用されるエタノールの非経口による長期投与における生体への安全性が心配である。そのため、注射・点滴剤中のエタノール使用量を少なくして本剤中の目的化合物の含量を高める検討も行ったが充分な効

果は得られなかった。

またリン脂質は水に不溶性で溶液とすることが困難であり、乳化剤を用いて乳液状にしても増粘するため注射剤として使用困難であり、また薬効も低下する。

そこで、高投与量に伴う溶剂量や被覆基材の連続大量摂取の問題を解決し、目的部位へのより多くの取込みを可能にする高濃度製剤が必要である。

本発明は、生理効果を示す高度不飽和脂肪酸を有するホスファチジルコリンを効率良く大量投与できる剤型である高濃度リボソーム製剤を提供することを目的とする。

（課題を解決するための手段）

本発明は、一般式 (1) :



（式中、R₁ はオレオイル基又はバルミトイル基であり、R₂ はエイコサベンタエノイル基又はド

コサヘキサエノイル基である）で示される化合物の少なくとも 1 種を構成成分とするリボソーム製剤である。

上記一般式 (1) に含まれる化合物としては、例えば次のものが挙げられる。

S n - 1 - オレオイル - S n - 2 - エイコサベンタエノイル - S n - 3 - グリセロホスホコリン (1)、

S n - 1 - バルミトイル - S n - 2 - エイコサベンタエノイル - S n - 3 - グリセロホスホコリン (2)、

S n - 1 - オレオイル - S n - 2 - ドコサヘキサエノイル - S n - 3 - グリセロホスホコリン (3)、

S n - 2 - バルミトイル - S n - 2 - ドコサヘキサエノイル - S n - 3 - グリセロホスホコリン (4)、

(1) および (2) の混合物 (5)、

(3) および (4) の混合物 (6)、

(1) および (3) の混合物 (7)。

上記化合物は、特願昭62-318617、特願昭62-318616、特開昭61-12919に記載された方法により得られる。

即ち、上記ホスファチジルコリン類は、天然構造のグリセロホスホコリンを出発原料として化学的合成と各種ホスホリバーゼによる生化学的反応を組み合わせた方法および卵黄や魚卵由来のリン脂質中のホスファチジルコリンより逆相分配カラムクロマトグラフィーによる単離法により製造できる。特に、一般式(I)の化合物は出発原料となるリン脂質の起源およびアシル化反応時の脂肪酸種を選択することにより個々の目的の化合物を得ることができる。

本発明者らは一般式(I)の化合物の高投与量に適し、目的部位へのより多くの取込みを可能にする剤型を検討した。

本発明者らが用いた生理活性を有する一般式(I)の化合物はホスファチジルコリン群であった。これらのホスファチジルコリンを高含量に含む剤型を検討した過程において、一般式(I)の化合物は

その構成脂肪酸がすべて炭素数14個以上であることが判明した。炭素数14個以上の脂肪酸を2本有するホスファチジルコリンは分子形態上、極性部位と非極性部位との形状的バランスが良いためシリンド型分子と考えられ、水溶液中で単独又は組み合わせにより、二分子膜構造の分子集合体をとり、閉鎖小胞を形成してリボソームとなると推定した。事実、一般式(I)の化合物は水溶液及びリン酸緩衝液中で50mg/ml以上の高濃度のリボソームが形成され、その安定性も優れていた。

一般に不飽和脂肪酸基を有するホスファチジルコリンのリボソームは、リボソーム膜成分の細胞への移行やリボソームと細胞膜との脂質成分との交換等の移動が速いので、本発明で形成される一般式(I)の化合物によるリボソームは、これらの化合物の生理活性を発揮するのに適している。

ホスファチジルコリン類は、熱、pH、酵素等により加水分解されやすく、特に不飽和脂肪酸基を有するホスファチジルコリンは自動酸化も受けやすい。そこで、一般式(I)の化合物によるリボ

ソーム形成時に、これらに対して抗酸化剤としてビタミンEあるいはビタミンEエステルを加えることができる。これらは血漿中でも安定化作用が見られる。また全工程を不活性ガス気流下で行い、得られたリボソームは電位差滴定を用いた過酸化脂質定量法（原、長谷川、鈴木、戸谷、油化学、34、283、1985）で20meq/kg以下になるように調整すると良い結果が得られる。

リボソーム用のホスファチジルコリンには天然産の卵黄レシチン、大豆レシチン及び水添大豆レシチンと合成品のジバルミトイールホスファチジルコリン、ジオレオイルホスファチジルコリン等が市販されているが、これらのホスファチジルコリン類は比較的相転移温度が高いためリボソーム形成時に70~80℃の加熱を受ける。しかしながら本発明の一般式(I)の化合物は、その構造中に高度不飽和脂肪酸を有するため相転移温度は非常に低い。そのため、これらの化合物単独では20℃以下できれいにリボソームが形成され、全く加熱の必要がない。また70~80℃に保持してリボソーム形

成を行うとエクストルーダー（押出成形機）によりSUV（スマール・ユニラメラ・ベシクル：小さな一枚膜リボソーム）調製後にベシクルの融合が生じて安定性が低下する。しかし、これらのリボソームの安定化を図るためコレステロールやコレスタン等のステロール類を膜形成剤として添加してからリボソーム形成を行う場合、20℃以下では安定性が悪く、むしろ70~80℃では安定性が良かった。特にコレステロール添加の場合、一般式(I)の化合物2部に対してコレステロール1部以下が適当である。

血漿、血清中でのリボソームの安定性はビタミンEやコレステロールを加えた方がそれぞれ良く、特にコレステロールを添加した場合は、肝臓や脾臓への分布が抑制されるので血中濃度が高くなり血中消失が遅れる。それゆえ、一般式(I)の化合物によるリボソーム化は、これらの目的部位へのより多くの取込みを可能にし、これらを高濃度に含有する剤型を提供するため、連続した高投与量の実施が可能となる。

本発明に使用される一般式(1)の化合物を用いるリポソーム製剤を製造する方法としては、超音波処理法、逆相エバボレーション法、注入法等を採用できる。リポソームは、その形態から、多重層型、小さな一枚模型、大きな一枚模型、逆相蒸発法型及び巨大型に大別されるが、本発明の一般式(1)の化合物を構成成分とするリポソームはいずれの形態にすることもできる。

本発明のリポソーム製剤は、一般式(1)の化合物を構成成分の一成分として30% (W/W) 以上、好ましくは60~100% 用いるのが有利である。リポソーム調製時に、一般式(1)の化合物以外の膜形成剤として、この化合物の生理活性に影響を与えるコレステロールやコレスタン等のステロール類や抗酸化剤としてビタミンE類を添加することは好ましいが、脂質二重膜の電荷に影響を与えるステアリルアミン、ジセチルホスフェート、ホスファチジン酸等の荷電物質は一般式(1)の化合物の生理活性の発現には好ましくない。

本発明のリポソーム調製法には特に制限はない

が、この中で主に用いられる超音波処理法は次の通りである。即ちガラスビーズを入れたナスフラスコの内壁に窒素気流下で、一般式(1)の化合物、必要によりその他の膜安定剤及び抗酸化剤を取り、ヘキサン、クロロホルム、エタノール等の脂質系物質を溶解させる浴媒に溶解させ、その後に、窒素気流下で浴媒を留去し薄膜を形成させる。このフラスコ中に、精製水、生理食塩水、リン酸緩衝液等を加え、得られた混合物を常温又は70°C程度に保持しながら振盪、好ましくは超音波振盪し、リポソームの分散液を得る。得られた分散液をエクストルーダーを用いて、0.2 mmから0.05 mmのフィルターを通してリポソームの粒径を整える。この分散液をそのままの状態で利用することもできるし、また、この分散液を凍結乾燥により粉末化して利用することもできる。

上記の調製法に従って調製したリポソームは、膜形成剤の組成の違い等により調製時や保存中に粒径などが変化することがあるので、蛍光脂質を用いた蛍光顕微鏡観察によりリポソーム形成の確

認を行った。また、調製したリポソームの生理活性に関して、抗アレルギー作用は5-リボキシゲナーゼの阻害率、制癌活性は赤芽球性白血病細胞の分化誘導率を測定することにより判定した。その結果、一般式(1)で示される化合物をリポソーム製剤に剤型加工しても、その生理活性は全く失われることが確認された。

本発明のリポソーム製剤は、経口及び非経口投与のいずれも可能であり、特に注射剤や点滴剤として使用できる。また投与量は症状により左右されると大人では一日当たり、有効成分として0.01~200 mg/kg体重の範囲が適当である。

(発明の効果)

本発明によって提供されるリポソーム製剤は、抗血栓、抗喘息や抗腫瘍作用等の生理活性を示すエイコサペンタエン酸やドコサヘキサエン酸をアルキル基に有するホスファチジルコリンを用いるのを特徴とするリポソーム様小胞体自身が強力な薬効を有するものである。そして、従来はどう糖を加えてくるものである。そして、従来はどう糖を加えてくるものである。

種試形剤を加えて脂溶性カプセル剤にしか加工できなかったものが、本剤ではリポソームに製剤化したため、高濃度の水溶液として腹腔や静脈に大量投与することができるようになった。

(実施例)

以下、本発明に使用する化合物の製造例、製剤例、急性毒性試験例、および薬理試験例を示して本発明を更に具体的に説明する。

以下、前記化合物(1)、(2)、(3)、(4)、(5)、(6)、(7)の一部の具体的な製造方法を製造例として示す。

(製造例)

製造例 1

化合物(1)

脱水したクロロホルム50 ml中に、1-オレオイル-3-グリセリルホスホリルコリン 776 mg (1.49ミリモル)、エイコサペンタエン酸無水物 960 mg (1.64ミリモル)、及びN,N-ジメチル-4-アミノピリジン 203 mg (1.66ミリモル)を加え、室温で攪拌しながら24時間反応させた。

反応終了後、反応混合物中のN,N-ジメチル

-4-アミノピリジンを除去するため、酸性陽イオン交換樹脂（ローム・アンド・ハース社製、登録商標アンバーライト 200 C）25g 及び塩基性陰イオン交換樹脂（ローム・アンド・ハース社製、登録商標アンバーライト I R C - 50 及びアンバーライト I R A - 93 の等量混合物）50g を直径 3.0 cm、長さ 50cm のガラスカラムに充填した中を、クロロホルムを用いて洗した。

この処理溶液をシリカゲル薄層クロマトグラフィー（展開溶媒はクロロホルム：メタノール：水 = 65 : 25 : 4、発色はヨウ素）で分析した結果、RF 値 0.1~0.3 (N, N-ジメチル-4-アミノピリジンと酸無水物の複合体を示す) の紫色の発色が完全に消失した。

クロロホルムを減圧留去し、残留物を 20g のシリカゲルを充填した直径 1.5cm、長さ 50cm のガラスカラムを用いて、クロロホルム 500ml を用いて溶出したものをフラクション 1 (F₁)、クロロホルム：メタノール = 10 : 1、500ml を用いて溶出したものをフラクション 2 (F₂)、クロロホルム：メ

タノール = 5 : 1、1500ml を用いて溶出したものをフラクション 3 (F₃) とした。

F₁、F₂、F₃ を、シリカゲル薄層クロマトグラフィー（展開溶媒はクロロホルム：メタノール：水 = 65 : 25 : 4、発色はヨウ素）で分析した結果、目的物である 1-オレオイル-2-エイコサベンタエノイル-3-グリセロホスホコリンは F₃ 中に含まれていた。

F₃ の溶媒を減圧留去し、1-オレオイル-2-エイコサベンタエノイル-3-グリセロホスホコリン 70mg を得た。

得られた 1-オレオイル-2-エイコサベンタエノイル-3-グリセロホスホコリンに対して、FAB-MS の直接導入法で分析した結果、この化合物の分子イオン 806 (M + H)⁺ が明瞭に認められた。また、未反応原料である 1-オレオイル-3-グリセリルホスホリコリンは認められなかった。

製造例 2

化合物 (2)

脱水したクロロホルム 50ml 中に、1-バルミトイール-3-グリセリルホスホリコリン 1000mg (2.02 ミリモル)、エイコサベンタエン酸無水物 2300mg (3.92 ミリモル)、及び N, N-ジメチル-4-アミノピリジン 500mg (4.10 ミリモル) を加え、室温で攪拌しながら 24 時間反応させた。

反応終了後、製造例 1 に従って精製した。その結果、1-バルミトイール-2-エイコサベンタエノイル-3-グリセロホスホコリン 563mg を得た (收率 35.8%)。

製造例 3

化合物 (3)

脱水したクロロホルム 50ml 中に、1-オレオイル-3-グリセリルホスホリコリン 776mg (1.49 ミリモル)、ドコサヘキサエン酸無水物 1.047g (1.64 ミリモル)、及び N, N-ジメチル-4-アミノピリジン 203mg (1.66 ミリモル) を加え、室温で攪拌しながら 24 時間反応させた。

反応終了後、製造例 1 に従って精製した。その結果、1-オレオイル-2-ドコサヘキサエノイ

ル-3-グリセロホスホコリン 773mg を得た (收率 62.5%)。

製造例 4

化合物 (5)

採卵後ただちに冷凍したニジマスの受精卵 300g をクロロホルム / メタノール (2/1, vol/vol) 混液 1.2 L に入れ、ホモミキサーで 30 分、高速で剪断抽出した。遊離された混ケーキを上記溶媒 0.4L で抽出する操作を 2 回行い、全液体にクロロホルム 0.6L と蒸留水 0.6L を加え、クロロホルム層を集めて脱溶媒して、20.2g の全脂質を得た。

得られた全脂質を氷冷アセトン 250ml に入れ、攪拌下 10 分間抽出し沈澱を回収した。この操作を 4 回繰り返してリン脂質分画 10.4g を得た。

リン脂質全量を 4 等分して、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (富士ゲル CG-3、水戸化學製、直径 5cm、長さ 40cm のカラムに 700cc) に付した後、クロロホルム / メタノール (4/1, vol/vol) 混液の溶離液系でホスファチジルコリン以前に溶出するリン脂質を除去し、さらにクロロホル

ム／メタノール(3/2、vol/vol)混液の溶媒液系で溶出し、TLC(展開溶媒：クロロホルム／メタノール／水、65/25/4、vol/vol/vol)でRF値0.20～0.30(ホスファチジルコリン)に単一スポットが認められる分画を集めた。同一操作を4回繰り返してホスファチジルコリン2.7gを得た。

次いで、得られたホスファチジルコリンを1%wt/volのメタノール溶液とし、東ソー製の全自动大量分取液体クロマトグラフィーHLC-837にODS充填カラム(直径2インチ、長さ60cm)を装着して、溶離液としてメタノールを40mL/min流して、1バッチ当たり5mLの試料溶液を注入した。溶出時間100分近辺に巨大なメインピークが流出し、その前に4本、後に3本のマイナーピークが検出された。各ピークに相当する分画からは1バッチ当たり1～15mL分取された。

各分画中のホスファチジルコリンの脂肪酸組成を測定した結果、メインピークが流出する直前のピークが、エイコサペンタエン酸を主体とする成分であることがわかった。本分画は1バッチ当た

り5mLが回収され、FAB-MSによって分子量780([M+H]⁺)、分子量806([M+H]⁺)が認められ、脂肪酸組成はエイコサペンタエン酸40.6%、オレイン酸17.3%、パルミチン酸23.9%であり、ホスホリバーゼA₂処理によるSn-2位のエイコサペンタエン酸量は78.6%であった。

原料のメタノール溶液の一部100mLを用い、10バッチを行い該化合物(1-パルミトイール-2-エイコサペンタエノイル-3-グリセロホスホコリン及び1-オレオイル-2-エイコサペンタエノイル-3-グリセロホスホコリン)43mLを単離した。

(製剤例)

製剤例1

窒素気流下、ガラスピースを多数入れた20mLのナスフラスコに化合物①20mL及び8-アニリノ-1-ナフタレンスルホン酸アンモニウム(リボソーム形成確認のための蛍光物質)0.32mLを各々量り取りクロロホルムで溶解した後、エバボレーターで窒素気流下、溶媒を留去した。この残留物に

生理的食塩水2mLを加え、ボルテックスミキサー(20分間、室温)を用いて十分振盪し、得られたサスペンションを2.0から0.05mLのボアサイズのフィルターを装着したエクストルーダーを用いて粒径を整えた。

得られたサスペンションはリボソーム様小胞体を形成した溶液に特徴的に観察される蛍光性を帶びた透明溶液となり、これを試料とした蛍光顕微鏡観察により粒径0.1μm前後の形状を有する閉鎖小胞体(リボソーム)を確認した。得られたリボソームの過酸化脂質量(電位差滴定法)は20meq/kgであった。

製剤例2

窒素気流下、ガラスピースを多数入れた20mLのナスフラスコに化合物③40mL、コレステロール5mL及び8-アニリノ-1-ナフタレンスルホン酸アンモニウム0.32mLを各々量り取りクロロホルムで溶解した後、エバボレーターで窒素気流下、溶媒を留去した。この残留物にリン酸緩衝液2mLを加え、ボルテックスミキサー(20分間、70℃)を用いて十分振盪し、得られたサスペンションを2.0から0.05mLのボアサ

用いて十分振盪し、得られたサスペンションを、2.0から0.05mLのボアサイズのフィルターを装着したエクストルーダーを用いて粒径を整えた。

得られたサスペンションはリボソーム様小胞体を形成した溶液に特徴的に観察される蛍光性を帶びた透明溶液となり、これを試料とした蛍光顕微鏡観察により粒径0.1μm前後の形状を有する閉鎖小胞体(リボソーム)を確認した。得られたリボソームの過酸化脂質量(電位差滴定法)は15meq/kgであった。

製剤例3

窒素気流下、ガラスピースを多数入れた20mLのナスフラスコに化合物⑤100mL、コレステロール10mL、バートコフェロール10mL及び8-アニリノ-1-ナフタレンスルホン酸アンモニウム0.32mLを各々量り取りクロロホルムで溶解した後、エバボレーターで窒素気流下、溶媒を留去した。この残留物に精製滅菌水2mLを加え、ボルテックスミキサー(20分間、70℃)を用いて十分振盪し、得られたサスペンションを2.0から0.05mLのボアサ

イズのフィルターを装着したエクストルーダーを用いて粒径を整えた。

得られたサスペンションはリボソーム様小胞体を形成した溶液に特徴的に観察される蛍光性を帯びた透明溶液となり、これを試料とした蛍光顕微鏡観察により粒径 0.1μm 前後の形状を有する閉鎖小胞体（リボソーム）を確認した。得られたりボソームの過酸化脂質量（電位差滴定法）は 18meq/kg であった。

〔急性毒性試験〕

体重 25~32g の 5 遅令の雄雌の ICR 系マウスを 1 群 10 匹として、製剤例 2 のリボソーム製剤を投与用量を 5000mg/kg の 1 回の用量とし腹腔内投与した。投与後 14 日間観察したが、死亡と一般状態観察とも異常は認められず、体重は雄雄とも順調に増加した。投与後 14 日の剖検結果も異常は認められなかった。製剤例 2 のリボソーム製剤を ICR 系マウスに腹腔内投与した時の最小致死量は雄雄とともに、5000mg/kg 以上であった。本試験に用いた製剤例 2 のリボソーム製剤は構成成分中の

蛍光物質を除いたものを使用した。

薬理試験例

試験例 1

5-リボキシゲナーゼの活性測定法（抗アレルギー性） RBL (rat basophytic leukemia cell) -1 細胞を 10% ウシ胎仔血清存在下で MEN 培地で培養した。培養後、遠心分離法で RBL-1 細胞を集めめた後、リン酸緩衝液で洗浄した。洗浄後、リン酸緩衝液を加え音波発生器で細胞を破壊した。破壊した細胞を含む液を 600×G、10,000×G の遠心分離にかけ、その上清を酵素液として用いた。

本酵素は -80°C で 6 ヶ月以上安定した活性が得られた。本酵素 0.5μM に、最終的に 2 mM の塩化カルシウム溶液を加えた後、¹⁴C-アラキドン酸 0.2 μCi と 15 分間反応させ、その生成物を抽出し、TLC により分離同定した。活性測定は ¹⁴C-アラキドン酸からの転換活性をもって表示した。

製剤例 1、2、3 のリボソーム製剤、化合物(1)および(5)を用いて、5-リボキシゲナーゼの活性阻害効果の試験を上記試験例に準じて行い、その

結果を ID₅₀ (50% 阻害値) で表現した。

試験結果、ID₅₀ (μM)

化合物(1)	3	化合物(5)	12
製剤例 1	17	製剤例 2	5
製剤例 3	15		

以上の結果から一般式(1) で示される化合物の 5-リボキシゲナーゼの活性阻害効果は、リボソーム製剤に加工されることによっても変更なく優れた活性を保持していた。

試験例 2

フレンド白血病細胞（マウス赤芽球性白血病細胞、B 8 細胞）に対する試験を行った。HAM の F-12 培地 (GIBCO 製) に 15% の牛胎児血清および 60mg/ml のカナマイシンを加えたものに、 $2.5 \times 10^3 \text{ cell}/\text{ml}$ となるように B 8 細胞を接種し、これに所定量の被験化合物を加えた（最終容量 5 ml）。

8.0% 炭酸ガス中、37°C で 7 日間培養した後、オルキン (Orkin) のベンジジン染色法により染色し、染色された細胞数、即ち、赤血球への分化に

よりヘモグロビンを生成するようになった細胞数を測定し、全細胞に対する比率から分化誘導率を求めた。

製剤例 1、2、3 のリボソーム製剤、化合物(1)および(5)を用い前記試験法によりフレンド白血病細胞の分化誘導活性を調べ、その結果を分化誘導率で表現した。

試験結果 添加濃度 40mg/ml

化合物(1)	22%	化合物(5)	24%
製剤例 1	23%	製剤例 2	18%
製剤例 3	25%		

以上の結果から一般式(1) で示される化合物の赤芽球性白血病細胞の分化誘導効果は、リボソーム製剤に加工されることによっても変更なく優れた活性を保持していた。

なお、本試験に用いた製剤例 1、2、3 のリボソーム製剤は構成成分中の蛍光物質を除いたものを使用した。